



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : A01N 1/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/03933 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. April 1991 (04.04.91)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE90/00691</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. September 1990 (08.09.90)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 39 30 510.4 13. September 1989 (13.09.89) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BLUTSPENDEDIENST DER LANDESVERBÄNDE DES DEUTSCHEN ROTEN KREUZES NIEDERSACHSEN, OLDENBURG UND BREMEN G.G.M.B.H. [DE/DE]; Eldagsener Str. 38, D-3257 Springe 1 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : MOHR, Harald [DE/DE]; Rühmkorffstr. 11, D-3000 Hannover 1 (DE). LAMBRECHT, Bernd [DE/DE]; Marienstraße 1, D-3257 Springe 4 (DE).</p>		<p>(74) Anwalt: SCHUPFNER, Gerhard, D.; Müller, Schupfner & Gauger, Karlstraße 5, D-2110 Buchholz (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: PROCESS FOR INACTIVATING VIRUSES IN BLOOD AND BLOOD PRODUCTS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR INAKTIVIERUNG VON VIREN IN BLUT UND BLUTPRODUKTEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a process for inactivating viruses in blood and blood products in which phenothiazine dyes are added to the solutions or suspensions, which are then irradiated with light. The use of a very small concentration of phenothiazine dyes prevents any adverse effects on the plasma proteins. Inactivation is effected by the immediate irradiation of the blood sachet. After irradiation the dyes can be separated from the blood again by passing the blood over adsorbing agents.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blut und Blutprodukten, bei dem die zu behandelnden Lösungen bzw. Suspensionen mit Phenothiazinfarbstoffen versetzt und anschließend mit Licht bestrahlt werden. Durch die Verwendung einer sehr geringen Konzentration an Phenothiazinfarbstoffen werden schädigende Einwirkungen auf die Plasmaproteine ausgeschlossen. Die Inaktivierung erfolgt durch unmittelbare Bestrahlung der Blutbeutel. Nach der Bestrahlung lassen sich die Farbstoffe aus dem Blut wieder abtrennen. Hierzu wird das Blut über Adsorptionsmittel geleitet.</p>			

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mail
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monac	oUS	Vereinigte Staaten von Amerika

1

5 VERFAHREN ZUR INAKTIVIERUNG VON VIREN IN BLUT UND BLUTPRO-
DUKTEN

Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von
Viren in Blut und Blutprodukten, bei dem die zu behandelnden
Lösungen bzw. Suspensionen mit Phenothiazinfarbstoffen ver-
setzt und anschließend mit Licht bestrahlt werden.

15 Es ist bekannt, daß photodynamische Substanzen in Verbindung
mit sichtbarem Licht oder UV-Licht virusinaktivierend wirken
können. Ursache hierfür ist die Affinität dieser Stoffe zu
äußereren Virusstrukturen oder zur Nukleinsäure. Beides trifft
für Phenothiazinfarbstoffe zu. Sie reagieren mit den Mem-
branstrukturen umhüllter Viren und schädigen diese unter
20 Lichteinfluß irreversibel, wodurch das Virus seine Infektio-
sität verliert (vgl. Snipes, W. et al., 1979, Photochem. and
Photobiol. 29, 785-790). Ferner interagieren sie mit der
viralen RNA oder DNA, insbesondere mit den Guaninresten.
Nach Bildung eines Farbstoff-Nukleinsäure-Komplexes wird
25 dieser durch Lichtenergie angeregt, sodaß es zur Denaturie-
zung der Nukleinsäure und letztlich zu Strangbrüchen kommt.
Weiterhin bewirken Phenothiazinfarbstoffe die Umwandlung von
molekularem Sauerstoff in Sauerstoffradikale, die hoch reak-
tiv sind und auf verschiedene Weise viruzid wirken können
30 (vgl. Hiatt, C.W., 1972, in: Concepts in Radiation Cell Bio-
logy, pp. 57-89, Academic Press, New York; Oh Uigin et al.,
1987, Nucl. Acid. Res. 15, 7411-7427).

5 Im Gegensatz zu anderen photodynamischen Farbstoffen zur Virusinaktivierung sind Phenothiazinfarbstoffe wie Methylenblau, Neutralrot und Toluidinblau deswegen von Bedeutung, weil sie schon in Verbindung mit sichtbarem Licht eine Reihe von Viren inaktivieren können, darunter auch solche, die
10 sich in humanem Plasma befinden und keine Lipidhüllen besitzen, wie z.B. das Poliovirus.

Hinzu kommt, daß z.B. Methylenblau (MB) und Toluidinblau (TB) selbst therapeutische Anwendung finden, u.a. als Antidot bei Kohlenmonoxidvergiftungen und in der Langzeittherapie psychotischer Erkrankungen. Hierbei kommen ohne bedeutsame Nebenwirkungen Mengen von MB bzw. TB zur Anwendung (1 - 2 mg/kg Körpergewicht), die weit höher sind als diejenigen, die zur Virusinaktivierung notwendig sind. Die geringen Toxizitäten von MB und TB werden auch durch tierexperimentelle Daten belegt.
15
20

Seit dem Jahre 1955 wird in der Fachwelt davon ausgegangen, daß Farbstoffkonzentrationen, insbesondere bei Toluidinblau, unterhalb von 2,5 µM nicht virusaktivierend wirken. (Vgl. F. Heinmets et al., 1955, Joint Report with the Naval Medical Research Institute, Walter Reed Army Institute of Research, USA)
25

30 Bei den herkömmlichen Verfahren zur Virusinaktivierung mit Phenothiazinfarbstoffen liegen die Farbstoffkonzentrationen zwischen 10 µM und 100 µM. Bei diesen Konzentrationen besteht aber der Nachteil, daß es nicht nur zur Virusaktivierung, sondern auch zur Inaktivierung von Plasmaproteinen
35 wie z.B. der Gerinnungsfaktoren kommt. Dies ist wohl der Grund, weshalb Phenothiazinfarbstoffe bislang keine Rolle bei der Virusinaktivierung in Blut und Blutprodukten erlangt haben.
--

1

5 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin,
ein Verfahren zur Virusaktivierung zu entwickeln, bei dem
Viren verschiedener Art ohne funktionelle Beeinträchtigungen
der Plasmaproteine abgetötet werden. Des weiteren besteht
die Aufgabe der Erfindung darin, das Verfahren so einfach zu
10 gestalten, daß Blut bzw. Blutprodukte unmittelbar in han-
delsüblichen Blutbeuteln behandelt und gegebenenfalls die
zugesetzten Farbstoffe nach der Behandlung wieder entfernt
werden können.

15

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die
Phenothiazinfarbstoffe in einer Konzentration von 0,1 bis zu
10 μM , vorzugsweise von 0,1 bis zu 2 μM , eingesetzt werden
und die Bestrahlung unmittelbar in transparenten Behältnis-
20 sen wie Blutbeuteln erfolgt, die zur Blutentnahme und Aufbe-
wahrung dienen.

Die Bestrahlung erfolgt mit Tageslicht ausreichender Stärke
oder mit monochromatischem Licht vorzugsweise einer Kalt-
25 lichtquelle, die eine Wellenlänge im Bereich des Absorp-
tionsmaximums des jeweiligen Farbstoffs besitzt. Ferner
sollten folgende Bedingungen bei der Virusaktivierung im
Blutplasma bzw. in Plasmaproteinlösungen eingehalten werden.
Die Arbeitstemperatur sollte im Bereich von 0 bis 37 °C,
30 möglichst aber im Bereich von 4 bis 20 °C liegen. Die Inak-
tivierungsdauer beträgt insbesondere 5 Minuten bis 5 Stun-
den, vorzugsweise 10 Minuten bis 3 Stunden, und der pH-Wert
soll zwischen pH 5 und pH 9 liegen, vorzugsweise zwischen pH
6 und pH 8.

35

1

5 Der wesentliche Vorteil des Verfahrens liegt in seiner Einfachheit. F. Heinmets et al. (wie vorn angegeben) beschreiben eine hochaufwendige Apparatur, durch die z.B. Blutplasma geleitet werden muß. Dabei treten Wartungs- und vor allem auch Kapazitätsprobleme auf. Überraschenderweise wurde nun
10 festgestellt, daß man mit wesentlich geringeren Mengen Farbstoff auskommen kann und eine aufwendige technische Einrichtung zur Photoaktivierung nicht notwendig ist.

15 Unerwartet war auch die Feststellung, daß ein nicht umhülltes Virus wie Adeno, das sich unter physiologischen Umständen in Plasma nicht inaktivieren ließ, durch einen Frieren/Tauen-Schritt photosensitiviert und somit inaktiviert werden konnte. Dabei konnte eine Inaktivierung, unabhängig von der Reihenfolge der Arbeitsschritte Frieren/Tauen und Zugabe des
20 Farbstoffes, festgestellt werden. Unter Frieren wird ein Tiefgefriervorgang mit verflüssigten Gasen als Kältemittel bei Temperaturen von etwa - 20 °C bis etwa 80 K verstanden. In der Regel wird bei - 30 °C tiefgefroren.

25 Man kann die Virusinaktivierung unmittelbar in Blut- bzw. Plasmabeuteln durchführen, obwohl diese nur begrenzt lichtdurchlässig sind. Es muß lediglich der Farbstoff zugefügt werden. Dann wird der Beutel samt Inhalt belichtet, und daraufhin kann das jeweilige Produkt weiterverarbeitet werden.

30 Das Verfahren ist also ohne größeren technischen Aufwand durchzuführen und an Blutbanken hervorragend in den Arbeitsablauf bei der Prozessierung von einzelnen Blutspenden integrierbar. Die geringe Menge des eingesetzten Farbstoffs kann
35 in der behandelten Flüssigkeit verbleiben oder wird durch Adsorptionsmittel entfernt.

1

Als Blut bzw. Blutprodukte kommen unter anderem in Frage:

5

- Vollblut
- Erythrozytenkonzentrate
- Thrombozytenkonzentrate
- Plasma
- Serum

10

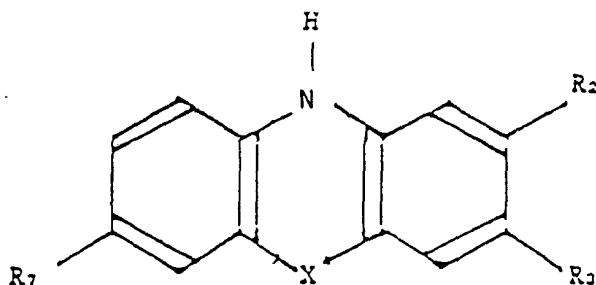
- Kryopräzipitat
- Konzentrate von Gerinnungsfaktoren
- Inhibitoren
- Fibronectin
- Albumin.

15

Zur Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Phenothiazine der folgenden Strukturformel geeignet.

20

25



30

	X	R ₂ :	R ₃ :	R ₇ :
Neutralrot	H	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₂
Toluuidinsblau	S	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₂
Methylenblau	S	H	N(CH ₃) ₂	N(CH ₃) ₂
Phenothiazin	S	H	H	H

35

1

Beispiel 1

5 Mit Methylenblau (MB) wird nachfolgend die Abhängigkeit der Photoaktivierung beim Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV) im Humanplasma aufgezeigt.

10 Ca. 5×10^7 Plaque Forming Units (PFU) pro ml VSV wurden in Humanplasma suspendiert und mit verschiedenen Konzentrationen an MB versetzt. Kontrollproben enthielten keinen Farbstoff. Das Probevolumen betrug 0,5 ml. Eine Kontrollprobe und ein Teil der MB-haltigen Proben wurden für 4 h bei Raumtemperatur mit sichtbarem Licht bestrahlt; die anderen wurden genauso lange im Dunkeln gelagert. Als Lichtquelle diente ein Diaprojektor, der mit einer 150 W Halogenbirne (Osram Xenophot) ausgestattet war. Der Abstand zwischen dem Objektiv des Diaprojektors, also der Lichtauslaßöffnung und den Proben betrug bei diesen und allen weiteren Versuchen 30 cm. (Mit Ausnahme der Virusaktivierung in Blutbeuteln).

Nach Ablauf der Bestrahlung wurde in allen Proben über einen Plaque-Assay der Virustiter bestimmt. Als Indikatorzellen dienten BHK-Zellen. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

30

35

1

5	Proben	MB-Konzen- tration (μ M)	Licht	Virusinaktivie- rungsfaktor
10	Kontr. 1	0	+	4,8
	Kontr. 2	0	-	1
	1	0,01	+	11,8
	2	0,1	+	28,5
	3	0,5	+	$> 10^6$
	4	1	+	$> 10^6$
15	5	10	+	$> 10^6$
	6	50	+	$> 10^6$
	7	100	+	$> 10^6$
	8	1	-	1
	9	10	-	5
20	10	50	-	11,8
	11	100	-	95

Tab. 1: Inaktivierung von VSV in Humanplasma mit und ohne Belichtung.

25 Belichtungsdauer: 4 h

Die Ergebnisse aus Tab. 1 zeigen, daß ab einer Konzentration von MB um 0,5 μ M der infektiöse Titer von VSV um mehr als 6 Zehnerpotenzen vermindert wurde. Deutlich höhere Konzentrationen des Farbstoffes, ab etwa 50 μ M, führten bereits ohne Belichtung zu einer signifikanten Verringerung des VSV-Titers.

35 Beispiel 2

Durch den folgenden Versuch wurde die Virusinaktivierung bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen bestätigt.

1

5 VSV wurde in Gegenwart von Plasma und verschiedenen Mengen Methylenblau in Aliquots von 500 µl Volumen über Nacht im Kühlraum aus einem Abstand von 30 cm mit dem Diaprojektor bestrahlt. Die Proben A - F wurden belichtet, Probe G blieb unbelichtet.

10

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. 2 dargestellt. Sie zeigen, daß unter den oben genannten Bedingungen das eingesetzte VSV um mehr als 4 Zehnerpotenzen inaktiviert wurde. Dazu waren 0,5 µM Methylenblau notwendig.

15

Wahrscheinlich hat allein durch die Inkubation über Nacht bei 4 Grad Celsius der Titer des VSV um 1 - 2 Zehnerpotenzen abgenommen, was den relativ niedrigen Ausgangstiter erklären würde. Dies wurde hierbei allerdings nicht mitgetestet.

20

Der Vergleich von A (belichtet) und G (dunkel) zeigt, daß Licht allein offenbar keinen großen Einfluß auf die Infektiosität des Virus ausübt.

25

Probe	MB-Endkonz. µM	Titer/200 µl	Inaktivierungs-faktor
A	0	2×10^4	2,2
B	0,01	$2,4 \times 10^4$	1,8
C	0,05	2×10^4	2,2
D	0,25	3×10^2	147
E	0,5	≤ 1	$\geq 4,4 \times 10^4$
F	1,0	< 1	$> 4,4 \times 10^4$
G	0	$4,4 \times 10^4$	1

Tab. 2: Virusinaktivierung bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen

1

5 Beispiel 3

Die Photoinaktivierung bei Viren in Gegenwart von Phenothiazinfarbstoffen ist jedoch abhängig von der Dauer der Belichtung. Um zu untersuchen, welche Belichtungszeiten zur Photoinaktivierung von VSV ausreichen, wurden 10^6 Plaque Forming Units (PFU) pro ml in Plasma suspendiert und für verschiedene Zeiten bei 22 °C wie beschrieben belichtet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt die Tabelle 3. Man erkennt, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Stunde Belichtungszeit ausreichte, um den infektiösen VSV-Titer um mehr als 6 Zehnerpotenzen zu vermindern.

	Probe	Belichtungszeit (min)	Inaktivierungs- faktor
20	Kontrolle	0	1
	1	5	50
	2	30	1666
	3	60	$> 10^6$

25

Tab. 3: Kinetik der MB-vermittelten Photoinaktivierung von VSV

30

Beispiel 4

Ein ähnlicher Versuch wurde anstatt mit MB in Gegenwart von 1 µM eines anderen Phenothiazinfarbstoffes, TB, durchgeführt. Die in der Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß auch mit Hilfe von TB VSV wirkungsvoll inaktiviert werden kann.

- 10 -

1

5

Probe	Belichtungszeit (min)	Inaktivierungs- faktor
Kontrolle	0	1
1	10	20
2	60	$> 4 \times 10^3$

10

Tab. 4: Kinetik der TB-vermittelten Photoinaktivierung von HSV

15

Die inaktivierende Wirkung der Phenothiazinfarbstoffe wurde auch beim Herpex-Simplex-Virus (HSV) sowie beim Human Immunodeficiency Virus Typ 1 (HIV-1) nachgewiesen.

20

25

Beispiel 5

In Gegenwart von Methylenblau ($1 \mu\text{M}$) wird auch HSV inaktiviert. Tab. 5 zeigt die Kinetik der MB-vermittelten Photoinaktivierung von HSV.

30

Probe	Belichtungszeit (min)	Inaktivierungs- faktor
Kontrolle	0	1
1	20	35
2	60	1500
3	180	$> 3 \times 10^4$

35

Tab. 5: Kinetik der MB-vermittelten Photoinaktivierung von HSV

1

5 Beispiel 6

Ein ähnlicher Versuch wurde mit dem AIDS-Erreger HIV-1 durchgeführt. Der Virustiter betrug 6×10^2 PFU/ml. Als Indikatorzellen dienten MT4-Zellen. Die Tabelle 6 zeigt, daß 10 HIV-1 besonders empfindlich gegenüber der Photoinaktivierung zu sein scheint: bereits innerhalb von 10 min wurde der Virustiter um mehr als das 600-fache reduziert.

15

	Probe	Belichtungszeit (min)	Inaktivierungs- faktor
	Kontrolle	0	1
	1	10	> 600
20	2	60	> 600
	3	120	> 600

25 Tab. 6: Kinetik der MB-vermittelten Photoinaktivierung von HIV-1

Beispiel 7

30

Bei dem Versuch, nicht umhüllte Viren unter den üblichen physiologischen Bedingungen in Gegenwart von 80 % Plasma zu inaktivieren, konnte kein Erfolg erzielt werden. Adenovirus wurde, als Modell für ein nicht umhülltes Virus, längere

35

1

5 Zeiten (4 °C, dunkel) in Gegenwart des Farbstoffes Methylenblau (MB), 1 µM, vorinkubiert. Danach erfolgte eine 30minütige Bestrahlung mit Halogenstrahlern (150 000 Lux). Dabei blieb die Infektiosität des Adenovirus unverändert.

	Probe	Dauer der Vorinkubation	Farbstoff	Titer (log10)
	Kontrolle	0 h	--	6,0
	1	0 h	MB	6,0
	2	1 h	MB	5,5
15	3	4 h	MB	6,0
	4	24 h	MB	6,0

20 Tab. 7: Einfluß der Vorinkubationsdauer auf die Photosensitivierung von Adenovirus.

Der Titer wurde als TCID50 (Berechnungsmethode "Tissue Culture Infectious Dosis" nach Spearman und Kaerber) bestimmt. Das Virus wurde auf FL-Zellen (definierte Zelllinie zur Virustitration geeignet) titriert.

25 Bei der Verwendung von Toluidinblau unter Beibehaltung der experimentellen Bedingungen konnte ebenfalls keine Reduktion des Virustiters festgestellt werden.

30 Um eine Inaktivierung von Adenovirus zu erzielen, wurde ein Frieren/Tauen-Schritt (F/T) unter Tiefgefrieren auf - 30 °C in den Versuchsablauf eingefügt. Dabei spielte die Reihenfolge des F/T und die Zugabe des Farbstoffes (1 µM MB) nur eine untergeordnete Rolle. Die Bestrahlung der Proben erfolgte gleichfalls mit Hilfe der Halogenstrahler. Gemessen wurden 120 000 Lux.

1

	Probe	Probenvorbereitung	Titer (log10)
	Kontrolle		7,5
	A	F/T	7,0
	B	F/T + 60 min Bestrahlung (Bestr.)	7,5
10	C	F/T + MB + 60 min Vorinkubat. + 60 min Bestr.	2,5
	D	MB + F/T	7,5
	E	MB + F/T + 10 min Bestr.	5,0
	F	MB + F/T + 30 min Bestr.	5,0
	G	MB + F/T + 60 min Bestr.	4,0
15			

Tab. 8: Photosensitivierung von Adenovirus aufgrund eines eingefügten F/T-Schrittes.

Die Durchführung der Virustitration erfolgte wie in Tab. 7 beschrieben.

Beispiel 8

25 Das besondere Problem bei der Anwendung hoher Farbstoffkonzentrationen liegt in der unmittelbaren Wirkung dieser Stoffe auf Plasmaproteine. In einem weiteren Versuch wurden daher unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen im Hinblick auf ihre Wirkung gegenüber der Aktivität von Gerinnungsfaktoren untersucht.

Humanes Plasma (2 ml Aliquots) wurde mit verschiedenen Mengen von MB versetzt. Direkt danach wurden die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren V, VIII und IX gemessen. Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich ist, werden sie in allen drei Fällen

1

5 dosisabhängig inhibiert, die der Faktoren VIII und V ab etwa 10 µM und die des Faktors IX bereits ab 2,5 µM. Demnach wirkt bei höheren Konzentrationen MB direkt auf die Proteine, ohne daß Licht einwirken muß.

10 Methylenblau

	Methylenblau (µM/l)	Faktor V E/ml	Faktor VIII E/ml	Faktor IX E/ml
15	0	0,80	0,38	2,0
	1	0,76	0,41	1,9
	2,5	0,78	0,41	1,6
	5	0,74	0,38	1,45
	10	0,54	0,35	1,20
	20	0,44	0,28	1,10

20 Tab. 9: Einfluß von MB auf die Aktivität von Gerinnungsfaktoren

25

Beispiel 9

Nun hat aber nicht nur die eingesetzte Farbstoffkonzentration, sondern auch die Belichtungszeit einen Einfluß auf die Aktivität von Gerinnungsfaktoren. Diese Zeitabhängigkeit wurde bei verschiedenen Methylenblaukonzentrationen ermittelt.

Humanes Plasma (2 ml-Aliquots) wurden mit verschiedenen Mengen an MB versetzt und für 1 bis 4 h belichtet (wie im Beispiel 1 beschrieben). Kontrollproben wurden nicht photo-behandelt. Wie die Tabelle 8 zeigt, werden die Aktivitäten der

1

5 drei Gerinnungsfaktoren V, VIII und IX zeit- und dosisabhängig inhibiert. Besonders bei den Faktoren VIII und IX zeigt sich, daß höhere MB-Konzentrationen und Licht-Expositionszeiten ab 2 h eine anscheinende Erhöhung der thrombolytischen Aktivitäten bewirken.

10

	Belichtungszeit	Konzentration Methylenblau µM/l	Faktor V E/ml	Faktor VIII E/ml	Faktor IX E/ml
15		0	0,86	0,33	1,20
		1	0,86	0,45	1,20
	0 h	2,5	0,82	0,33	0,46
		10	0,72	0,30	0,44
20		0	0,84	0,40	0,76
		1	0,72	0,24	0,92
	1 h	2,5	0,68	0,24	0,82
		10	0,47	0,16	0,68
25		0	0,82	0,44	0,10
		1	0,64	0,23	0,90
	2 h	2,5	0,68	0,22	0,72
		10	0,60	0,15	0,74
30		0	0,76	0,38	0,98
		1	0,56	0,16	0,94
	4 h	2,5	0,49	0,29	0,82
		10	0,42	0,27	0,64

35

Tab. 10: Einfluß von Licht und MB auf die Aktivität von Gerinnungsfaktoren: Zeit- und Dosisabhängigkeit

- 16 -

1

5 Beispiel 10

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Photoinaktivierung von Viren unmittelbar im Plasmabeutel vorgenommen werden. Dem Blut oder den Blutprodukten wird lediglich der Farbstoff in erforderlicher Menge zugesetzt und der Beutel dann mit Licht bestrahlt. Auf diese einfache Weise lassen sich Blutprodukte von einzelnen Spendern jederzeit behandeln.

15 In einem Versuch wurden drei Proben eines humanen Frischplasmas aufgetaut und in den Plasmabeuteln mit jeweils $1,5 \times 10^6$ PFU VSV versetzt. Zu zwei Proben wurde MB in Konzentrationen von 1 bzw. $10 \mu\text{M}$ zugefügt. Aus dem MB-freien Plasma wurde eine Probe entnommen und als Positiv-Kontrolle im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Dann wurden die drei Beutel zwischen zwei Plexiglasplatten eingespannt, um eine möglichst gleichmäßige Schichtdicke von ca. 2,5 cm zu gewährleisten. Sie wurden daraufhin aus einer Entfernung von ca. 90 cm mit Hilfe eines Diaprojektors bestrahlt. Nach 4 h wurden zur Bestimmung des Virustiters Proben entnommen und dieser mittels Plaque-Assay auf FL-Zellen gemessen. Die Ergebnisse in Tab. 9 zeigen, daß bereits $1 \mu\text{M}$ MB ausreicht, um im Plasmabeutel durch vierstündige Belichtung den infektiösen Titer von VSV um mehr als drei Zehnerpotenzen zu reduzieren. Auch bei Abwesenheit des Farbstoffes führte die Belichtung zu einer Reduktion des Virustiters, allerdings nur um etwa 50 %.

- 17 -

1

5	Probe	Bestrahlungs- dauer (h)	M8-Konzen- tration (μ M)	Beutel- Gewicht (g)	VSV-Titer (PFU/ml)
10	Kontrolle	0	0	323	5×10^3
	1	4	0	323	$2,5 \times 10^3$
	2	4	1	289	0
	3	4	10	257	0

15

Tab. 11: Photoinaktivierung von VSV im Plasmabeutel

Die zur Virusinaktivierung eingesetzten Phenothiazinfarbstoffe können insbesondere bei den hier angewendeten Konzentrationen von bis zu 1 μ M im Blut oder den Blutprodukten verbleiben, ohne daß es zu Nebenwirkungen kommt. Sie lassen sich aber auch nachträglich über Dialyse, Gelfiltration oder Adsorption wieder entfernen.

25

Von den genannten Methoden sind vor allem die adsorptiven von Interesse, weil sie den geringsten zeitlichen und technischen Aufwand machen und die betreffenden Plasmaproteinlösungen nicht verdünnt werden.

30

Einige Adsorbentien sind jedoch offensichtlich ungeeignet, wie z.B. die von Hiatt (Concepts in Radiation Cell Biology, pp. 57 - 89, Academic Press, New York, 1972) genannten Ionenaustauscher, weil sie neben dem Farbstoff auch sehr stark Plasmaproteine binden, u.a. Gerinnungsfaktoren.

35

1

Überraschenderweise konnte jetzt festgestellt werden, daß MB und andere Phenothiazinfarbstoffe sehr stark an verschiedene, kommerziell erhältliche Trenngele binden, darunter auch an solche, die keinerlei oder nur geringe Proteinbindung besitzen. Derartige Adsorbentien sind also für die nachträgliche Entfernung des Photooxidans besonders geeignet. Von den geprüften Adsorptionsmitteln kommen folgende zur Abtrennung von MB und anderen Phenothiazinfarbstoffen in Frage.

	Adsorbens	Hersteller bzw. Lieferant
	Daltosil 75	Serva, Heidelberg
15	Si 100-Polyol RP 18	Serva, Heidelberg
	Kieselgel 40	Merck, Darmstadt
	Nucleosil 50 A	Machery & Nagel, Düren
	Nucleosil 100 A	Machery & Nagel, Düren
	Vydac SC-201 RP	Machery & Nagel, Düren
20	CPG 40	Pierce Europe (Gebr. Faust GmbH), 5000 Köln
	Bio Beads	Bio Rad, München
	Amberlite	
	Adsorberharze	Rohm & Haas, Frankfurt

25 In den meisten Fällen reichten bei einer Einsatzkonzentration von 10 µM MB 2 g des jeweiligen Adsorptionsmittel, um den Farbstoff vollständig, im Batch angewandt, aus einer Plasmaproteinlösung zu extrahieren.

30 Als besonders gut geeignet erwiesen sich zwei Adsorbentientypen:

1. Silica Gele bzw. Kieselgele mit Porenweiten, die so gering sind (40 bis ca. 100 Å Durchmesser), daß Plasmaproteine nicht in die Gelmatrix eindringen können, wohl aber die niedermolekularen Farbstoffmoleküle, die dann infolge ionischer, elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen gebunden werden.

- 19 -

1

5 Beispiele für kommerziell erhältliche Adsorbentien dieses
Typs sind Matrix Silica Gel (Amicon, Witten), Daltosil (Serva, Heidelberg) und Kiesel-Gel (Merck, Darmstadt).

10 2. Gele der auf Basis Polystyrol-Divinylbenzol bzw. Acrylester-Polymerisat. Sie werden gleichfalls mit geeigneten Porengrößen hergestellt.

15 Beispiele für kommerziell erhältliche Gele dieser Typen sind Amberlite (u.a. Rohm und Haas, Frankfurt) und Bio Beads (Bio Rad, München). Sie dienen hauptsächlich dazu, um aus wässrigen Lösungen nichtpolare Substanzen bzw. oberflächenaktive Stoffe, z.B. Detergentien, zu entfernen. Sie sind nicht oder nur schwach polar.

20

Beispiel 11

25 Frischplasma wurde mit Methylenblau (10 µM) versetzt. 5 ml Aliquots wurden mit verschiedenen Mengen an Daltosil (Porenweite 75 Å) bzw. Bio Beads SM 16 (Porenweite 144 Å) versetzt und für 30 Minuten vermischt. Dann ließ man das Gel absitzen. Im Plasma wurden die Faktor VIII- bzw. Faktor V-Gehalte, die Extinktionen bei 660 nm sowie von einzelnen Proben 30 die Proteingehalte gemessen.

1

		E (660 nm)	Protein (mg/ml)	Faktor VIII (U/ml)	Faktor V (U/ml)
5	Frischplasma	0,909	66,8	1,10	1,20
	Frischplasma + MB	1,450	65,6	0,42	0,96
	Daltosil 50 mg	0,576	—	0,60	1,05
	100 mg	0,571	—	1,10	1,10
	250 mg	0,491	—	1,10	1,20
10	500 mg	0,477	66,8	1,25	1,20
	Bio Beads				
	SM 16 50 mg	0,666	—	0,82	1,05
	100 mg	0,571	—	1,05	1,10
	250 mg	0,571	—	1,05	1,10
15	500 mg	0,530	72,5	0,80	1,15

Tab. 12: Extraktion von Methylenblau im Beutel

20

Aus den Extinktionswerten ist ersichtlich, daß offenbar neben dem Farbstoff noch weitere Substanzen aus dem Plasma extrahiert werden. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um Plasmaproteine. Die Extinktionswerte des Plasmas, das mit 100 bis 250 mg Adsorbens pro 5 ml, d.h. mit 2 - 5 Gewichtsprozenten (% w/v) behandelt worden war, unterscheiden sich kaum von denen, bei welchen mit 10% w/v Adsorbens extrahiert worden war. Es ergibt sich somit, daß bei einer MB-Konzentration von 10 μ M in beiden Fällen 2 bis 5% w/v Adsorbens ausreichen, um bei batchweisem Betrieb den Farbstoff aus dem Plasma zu entfernen. Entsprechend weniger Adsorbens wird benötigt, wenn die Einsatzkonzentration des Farbstoffs niedriger ist.

35

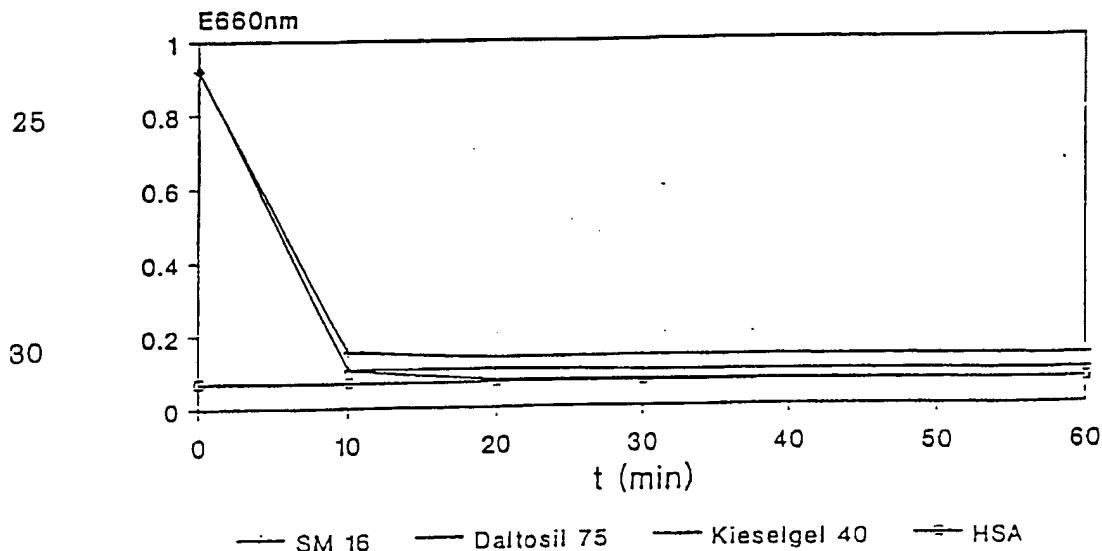
- 21 -

1

5 Beispiel 12

In einem weiteren Versuch wurde anstatt Blutplasma eine 5%ige humane Serumalbuminlösung (5% HSA) eingesetzt. Die MB-Konzentration war wiederum 10 μ M. 5 ml Aliquots wurden im 10 Batch mit jeweils 100 mg, d.h. 2% w/v folgender Adsorbentien für verschiedene Zeiten extrahiert: Daltosil (Porenweite 75 A, Kieselgel (Porenweite 40 A) sowie Bio Beads SM16 (Porenweite 144 A).

15 Wie die Abb. 1 zeigt, geht in allen drei Fällen die Extinktion bei 660 nm innerhalb von 20 - 30 Minuten auf einen konstanten Wert zurück, d.h. diese Zeit ist ausreichend, um das Photooxidans bei batchweisem Betrieb aus einer Plasmaproteinlösung zu entfernen. Wie die Abb. 1 auch zeigt, sind Bio 20 Beads SM16 und Kieselgel 40 im gegebenen Fall offenbar etwas bessere Adsorptionsmittel als Daltosil mit 75 A Porenweite.



35

Abb. 1: Adsorptionskinetik von Methylenblau (10 μ M) bei RT mit HSA 5% 100 mg Gel/5 ml HSA

1

5 Beispiel 13

Säulenchromatographische Entfernung von MB aus Plasmaproteinlösungen

Bei diesem Versuch sollte herausgefunden werden, ob die adsorptive Entfernung des Photooxidans auch auf chromatographischem Wege erfolgen kann. Hintergrund ist die Idee, daß man die Virusaktivierung mittels Farbstoff in Kombination mit Licht in einem Behältnis durchführt, beispielsweise einem Blutbeutel und dann die Plasmaproteinlösung über eine kleine dazwischengeschaltete Trennsäule, die das Adsorptionsmittel enthält, in ein weiteres Behältnis, z.B. einen zweiten Blutbeutel, überführt. Wäre jetzt die Einheit erster Beutel -Adsorptionssäule - zweiter Beutel vorgefertigt, verfügte man also über ein geschlossenes System, und man könnte auf einfache Weise unter geringstem Kontaminationsrisiko virusaktivierte Plasmaproteinpräparate, auch von einzelnen Donoren stammend, herstellen.

Hierzu wurden 250 ml 5%iger Albuminlösung mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch eine Trennsäule geleitet, die 5 ml Kieselgel (Porenweite 40 Å) enthielt. 10 ml-Fraktionen wurden aufgefangen und ihre Extinktionswerte bei 660 nm gemessen.

Wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, ließ sich das Gesamtvolumen der Albuminlösung bei Durchflußgeschwindigkeiten von 5 bzw. 7,5 ml/min durch die Säule leiten, ohne daß restliches MB in den Durchlauffraktionen nachzuweisen war. Der Zeitaufwand, um aus 250 ml Lösung den Farbstoff zu entfernen, liegt demzufolge bei höchstens 30 bis 35 Minuten.

- 23 -

1

5 Das Ergebnis des Versuches zeigt, daß die chromatographische
Abtrennung des Photooxidans keine Probleme bereitet, zum
anderen wird belegt, daß die oben skizzierte Herstellung
virusinaktivierter Plasmaproteinpräparate einzelner Donoren
möglich ist.

10

Ausgangsmaterial + MB		Durchlaufgeschwindigkeit (ml/min)	
		5	7,5
	Extinktion (660 nm): 0,067	Extinktion (660 nm)	
	Fraktion-Nr.: 1	0,002	0,001
15	3	0,000	0,001
	5	0,000	0,002
	7	0,002	0,003
	9	0,001	0,001
	11	0,000	0,001
20	13	0,000	0,001
	14	0,002	0,001

Tab. 13: Chromatographische Abtrennung von MB aus einer
5%igen Albuminlösung (MB-Konzentration 1 µM).

25

30

35

1

5
VERFAHREN ZUR INAKTIVIERUNG VON VIREN IN BLUT UND
BLUTPRODUKTEN

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blut und Blut-
10 produkten, bei dem die zu behandelnden Lösungen bzw. Suspensionen mit Phenothiazinfarbstoffen versetzt und anschließend mit Licht bestrahlt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Phenothiazinfarbstoffe in einer Konzentration von 0,1 bis zu 10 µM eingesetzt werden, und die Bestrahlung unmittelbar in
15 transparenten Behältnissen wie Blutbeuteln erfolgt, die zur Blutentnahme und Aufbewahrung dienen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Phenothiazinfarbstoffe in einer Konzentration von 0,1 bis zu 2 µM eingesetzt werden.
20
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Phenothiazinfarbstoff Toluidinblau oder Methylenblau verwendet wird.
25
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mit sichtbarem Licht im Bereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen Farbstoffs bestrahlt wird.
30
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu behandelnden Lösungen bzw. Suspensionen zunächst tiefgefroren und dann vor der Bestrahlung wieder aufgetaut werden.
35
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff vor dem Gefriervorgang zugesetzt wird.

- 25 -

1

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß
der Farbstoff nach dem Auftauen und vor der Bestrahlung
5 zugegeben wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, daß nach erfolgter Bestrahlung das
Blut bzw. die Blutprodukte zur Entfernung der Farbstoffe
10 über Adsorptionsmittel geleitet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß
dieses über zwei zur Blutentnahme geeignete Behältnisse wie
Blutbeutel mit einer dazwischengeschalteten Trennsäule, die
15 das Adsorptionsmittel für die Phenothiazinfarbstoffe ent-
hält, durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch
gekennzeichnet, daß als Adsorptionsmittel Kieselgele oder
20 solche auf der Basis von Polystyrol-Divinylbenzol oder
Acrylester-Polymerisaten eingesetzt werden.

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 90/00691

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all)

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

5
Int.Cl.: A 01 N 1/02

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched:

Classification System:	Classification Symbols
5 Int.Cl.:	A 01 N; C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched:

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 148, 1975, pages 291-293, Te-Wen Chang et al.: "Photodynamic Inactivation of Herpesvirus Hominis by Methylene Blue (38524)", see the whole document	1-10
X	Concepts in Radiation Cell Biology, chapter 2, 1972, pages 57-89, C.W. Hiatt, "Methods for Photo-inactivation of Viruses", see pages 79-83	1-10
X	Photochemistry and Photobiology, vol. 29, 1979 Wallace Snipes et al.: "Inactivation of lipid-containing viruses by hydrophobic photosensitizers and near-ultraviolet radiation", see page 785 - page 790 and the whole document	1-10
X	J. gen. Virol., vol. 41, 1978 Grace S.L. Yen et al.: "Photosensitization of Herpes Simplex Virus Type 1 with Neutral Red", see page 273 - page 281 and the whole document	1-10
P,X	WO, Al, 9007876 (NEW YORK UNIVERSITY) 26 July 1990, see claims 11-13: page 3, lines 20-23	1

* Special categories of cited documents: ¹¹

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

29 November 1990 (29.11.90)

Date of Mailing of this International Search Report

19 December 1990 (19.12.90)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.PCT/DE 90/00691

SA 39764

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 01/11/90
The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

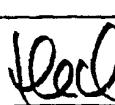
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 9007876	26/07/90	AU-D-	5085190 13/08/90

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

EPO FORM P0479

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 90/00691

I. KLASSEKIFIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. ⁵ A 01 N 1/02		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. ⁵	A 01 N; C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Band 148, 1975, Seiten 291-293, Te-Wen Chang et al: "Photodynamic Inactivation of Herpesvirus Hominis by Methylene Blue (38524)", Siehe das ganze Dokument --	1-10
X	Concepts in Radiation Cell Biology, Kapitel 2, 1972, Seiten 57-89, C.W. Hiatt, "Methods for Photo-inactivation of Viruses", Siehe Seiten 79-83 --	1-10
X	Photochemistry and Photobiology, Band. 29, 1979 Wallace Snipes et al.: "Inactivation of lipid-containing viruses by hydrophobic photosensitizers and near-ultraviolet radiation", siehe Seite 785 - Seite 790 und das ganze Dokument	1-10
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik – definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfiederischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfiederischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
29. November 1990	19. 12. 90	
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten F.W. HECK 	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art.	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. gen. Virol., Band. 41, 1978 Grace S.L. Yen et al.: "Photosensitization of Herpes Simplex Virus Type 1 with Neutral Red", siehe Seite 273 - Seite 281 und das ganze Dokument --	1-10
P,X	WO, A1, 9007876 (NEW YORK UNIVERSITY) 26 Juli 1990, Siehe Ansprüche 11-13; Seite 3, Zeilen 20-23 -- -----	1

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/DE 90/00691

SA 39764

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 01/11/90
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A1- 9007876	26/07/90	AU-D-	5085190

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

EPO FORM P0473